



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

DANIELLE MARCELA MENEZES DE MESQUITA

OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA
DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE AMEBAS
DO COMPLEXO HISTOLYTICA

SÃO CRISTÓVÃO

2018

Danielle Marcela Menezes de Mesquita

OTIMIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR) PARA
DIFERENCIAÇÃO MOLECULAR DE AMEBAS DO COMPLEXO HISTOLYTICA

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
do Bacharelado em Ciências Biológicas,
apresentado ao Departamento de Biologia da
Universidade Federal de Sergipe, como
requisito para a conclusão da disciplina de
Iniciação a pesquisa em Biologia II.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella

São Cristóvão, SE

2018

RESUMO

As parasitoses intestinais contribuem para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade no mundo, sendo a amebíase a segunda causa de morte entre as doenças parasitárias, com aproximadamente 100.000 mortes por ano. Para impedir que ocorra tratamento desnecessário de indivíduos com espécies de *Entamoeba* comensais, é de extrema importância diferenciá-las da *Entamoeba histolytica*, potencialmente patogênica. O exame microscópico de amostras fecais não é eficiente para a diferenciação das espécies de *Entamoeba*, sendo os métodos moleculares considerados úteis e confiáveis para a identificação e diferenciação dessas espécies, incluindo a PCR convencional, Nested-PCR e a Multiplex-PCR. O objetivo desse estudo foi otimizar técnicas de PCR para uma melhor obtenção de resultados na diferenciação de espécies de amebas do complexo *histolytica* e da *Entamoeba hartmanni*. Para isso, 16 amostras de fezes positivas na microscopia óptica para *E. histolytica*/*E. dispar* tiveram seu DNA extraído e, posteriormente, foram realizadas a PCR convencional para *E. hartmanni*, a Nested-PCR e Multiplex-PCR para *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*, com modificações dos protocolos originais para obtenção de melhores resultados na sua padronização. Na PCR Convencional foram observadas duas amostras positivas para *E. hartmanni*, no Nested-PCR uma amostra foi positiva para *E. dispar* e para a espécie *E. moshkovskii* nenhuma amostra foi positiva. Embora os resultados da otimização não tenham sido completamente satisfatórios em todas as amostras testadas devido à possível degradação dos reativos utilizados, os resultados prévios obtidos demonstram a importância da PCR como ferramenta eficaz para a detecção e diferenciação de espécies do gênero *Entamoeba*.

Palavras-chave: Amebíase, diagnóstico molecular, otimização, métodos moleculares.

ABSTRACT

Intestinal parasites contribute to increased morbidity and mortality rates in the world, with amebiasis being the second leading cause of death among parasitic diseases, with approximately 100,000 deaths per year. To prevent unnecessary treatment of individuals with commensal *Entamoeba* species, it is extremely important to distinguish them from potentially pathogenic *E. histolytica*. Optical microscopic examination of feces is not efficient for the differentiation of *Entamoeba* species, and molecular methods are considered useful and reliable for the identification and differentiation of these species, including conventional PCR, Nested-PCR and Multiplex-PCR. The aim of this study was to optimize PCR techniques for better results in the differentiation of amoeba species from the histolytic complex and *Entamoeba hartmanni*. For this, 16 positive stool samples were obtained by optical microscopy for *Entamoeba histolytica*/*E. dispar*. The results of the present study were similar to those of *E. hartmanni*, Nested-PCR, and Multiplex-PCR for *E. histolytica*, *E. dispar* and *E. moshkovskii*, with modifications of the original protocols to obtain better results in its standardization. In Conventional PCR two positive samples were observed for *E. hartmanni*, in the Nested-PCR one sample was positive for *E. dispar* and for *E. moshkovskii* species no sample was positive. Although the results of the optimization were not completely satisfactory in all the samples tested, due to the possible degradation of the reagents used, the previous results obtained demonstrate the importance of PCR as an effective tool for the detection and differentiation of species of the genus *Entamoeba*.

Keywords: Amebiasis, diagnosis, optimization, molecular methods

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cistos e trofozoítos de <i>E. histolytica</i>	10
Figura 2 - Cistos e trofozoítos de <i>E. histolytica</i> , <i>E. dispar</i> , <i>E. moshkovskii</i> e <i>E. hartmanni</i>	11
Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na PCR para <i>E. hartmanni</i> com as diferentes modificações à metodologia de Gomes et al., 2014	22
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do gradiente de temperaturas de anelamento para PCR de <i>E. hartmanni</i>	23
Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado da otimização de PCR convencional (0,5 µl de cada primer, 2,0 µl de DNA, anelamento a 48°C e 35 ciclos) para identificação de <i>E. hartmanni</i>	24
Figura 6 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado de PCR convencional para identificação de <i>E. hartmanni</i>	25
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado da otimização de Nested-PCR para identificação das espécies do complexo histolytica, com as diferentes modificações da metodologia de Paglia e Visca (2004)	26
Figura 8 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado do gradiente de temperaturas para a primeira reação de Nested-PCR para identificação das espécies do complexo histolytica	27
Figura 9- Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado da otimização da primeira reação de Nested-PCR nas condições ideais (48°C de anelamento, 2,5 µl de DNA e 0,5 µl de cada primer) para identificação das espécies do complexo histolytica	28
Figura 10- Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado comprometido por degradação de reagentes durante a otimização da primeira reação de Nested-PCR para identificação das espécies do complexo histolytica	29
Figura 11 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado da otimização da primeira reação de Nested-PCR (temperatura 50°C de anelamento) para identificação das espécies do complexo histolytica.....	30
Figura 12 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado da otimização da segunda reação de Nested-PCR (temperatura 48°C de anelamento) para identificação das espécies do complexo histolytica	31

Figura 13 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado comprometido por degradação de reagentes durante a otimização da segunda reação de Nested-PCR para identificação das espécies do complexo histolytica 32

Figura 14 - Eletroforese em gel de agarose (1,5%) mostrando resultado comprometido por degradação de reagentes durante a otimização da Multiplex-PCR 33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	7
2 REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1 AMEBÍASE	10
2.2 GÊNERO <i>ENTAMOEB</i> A	10
2.3 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS	10
2.3.1 <i>E. HISTOLYTICA</i> / <i>E. DISPAR</i>	11
2.3.2 <i>E. MOSHKOVSKII</i>	12
2.3.3 <i>E. HARTMANNI</i>	12
2.4 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	13
2.4.1 DIAGNÓSTICO COPROPARASITOLÓGICO	13
2.4.2 DIAGNÓSTICO MOLECULAR	13
2.4.2.1 PCR CONVENCIONAL.....	14
2.4.2.2 NESTED-PCR	14
2.4.2.3 MULTIPLEX-PCR	14
3 OBJETIVOS	16
3.1 OBJETIVO GERAL	16
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS.....	17
4.2 EXTRAÇÃO DO DNA	17
4.3 PCR PARA AMEBAS DO COMPLEXO <i>HISTOLYTICA</i> E <i>E. HARTMANNI</i>	17
4.3.1 PRIMERS UTILIZADOS	19
4.3.2 PCR CONVENCIONAL.....	19
4.3.3 PRIMEIRA REAÇÃO DO NESTED-PCR.....	19
4.3.4 SEGUNDA REAÇÃO DO NESTED-PCR.....	20
4.3.4 MULTIPLEX-PCR	21
4.4 ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR	21
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1 PCR CONVENCIONAL PARA A DETECÇÃO DE <i>E. HARTMANNI</i>	22
5.2 NESTED-PCR PARA <i>E. HISTOLYTICA</i> , <i>E. DISPAR</i> E <i>E. MOSHKOVSKII</i>	25
5.3 MULTIPLEX-PCR.....	32
6. CONCLUSÃO.....	34

1 INTRODUÇÃO

As parasitoses intestinais representam um grave problema de saúde pública, contribuindo para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade em grande parte do mundo, principalmente em países subdesenvolvidos (BUSATO et al., 2015).

A contaminação por parasitos intestinais pode ser assintomática ou causar diarreias e desconfortos abdominais, entre outros sintomas. A Organização Mundial da Saúde estima que 3,5 bilhões de pessoas em todo o mundo estão infectadas com algum parasito (WHO, 2018). A cada ano ocorrem aproximadamente 50 milhões de casos de amebíase em todo o mundo, resultando em até 100.000 mortes, perdendo apenas para a malária (GOMES et al., 2014).

No Brasil, o índice de parasitismo intestinal é bastante elevado devido a vários fatores, principalmente por ser um país em desenvolvimento, pois a transmissão das enteroparasitoses é mais prevalente em populações de baixo nível socioeconômico, com falta de acesso à água potável, alimentação inadequada e falta de saneamento básico (BUSATO et al., 2015).

Amebíase é uma infecção causada pelo parasito *Entamoeba histolytica*, podendo ser assintomática ou sintomática, apresentando manifestações clínicas como a colite amebiana e abscesso hepático amebiano. Aproximadamente 10% da população mundial está infectada, com maior incidência em países tropicais e subtropicais, devido as más condições sanitárias (SANTOS et al., 2007).

Para impedir que ocorra tratamento desnecessário de indivíduos com espécies de *Entamoeba* comensais, é de extrema importância diferenciá-las da *E. histolytica*, espécie potencialmente patogênica, não só para diagnosticar o paciente de forma correta, mas também para uma melhor compreensão dos dados epidemiológicos das infecções por esses parasitos (NGUI et al., 2012). Estima-se que aproximadamente 90% das infecções diagnosticadas como amebíase sejam causadas por *E. dispar*; muitos dados epidemiológicos relatados como *E. histolytica* foram obtidos antes da separação *E. histolytica*/*E. dispar* (GOMES et al., 2014).

Na maioria das vezes, as infecções causadas por espécies do gênero *Entamoeba* são diagnosticadas através de análises microscópicas das amostras fecais frescas ou fixadas. Entretanto, os cistos e trofozoítos de *E. histolytica* são difíceis de serem diferenciados das espécies *E. dispar*, *E. moshkovskii* e *E. hartmanni*, uma vez que são morfológicamente semelhantes (NGUI et al., 2012).

Alguns métodos moleculares são considerados úteis para a identificação e diferenciação confiável das espécies do gênero *Entamoeba*, principalmente as do complexo *histolytica* (*Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* e *Entamoeba moshkovskii*) e a *Entamoeba hartmanni*. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), incluindo a PCR convencional, Nested-PCR e a Multiplex-PCR, são técnicas que podem ser utilizadas para a diferenciação das diferentes espécies (GOMES et al., 2014).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Amebíase

Segundo a Organização Mundial de Saúde, o agente etiológico da amebíase em humanos é o protozoário *Entamoeba histolytica* (WHO, 2018). A transmissão desse parasito ocorre através de cistos presentes em água e alimentos contaminados, apresentando alta ocorrência em áreas com falta de saneamento (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2017).

O trofozoíto coloniza o lúmen e a mucosa intestinal para se alimentar de bactérias e eventualmente tecido, podendo aderir-se as células epiteliais do colón e causar disenteria com sangue e muco, secretam também proteases que destroem a matriz extracelular causando uma invasão da parede intestinal (SHIRLEY e MOONAH, 2016).

O trofozoíto pode atingir o fígado, sistema nervoso central e pele por meio da corrente sanguínea, podendo causar abscessos amebianos. A colite amebiana fulminante é uma manifestação clínica incomum que pode ser fatal, apresentando sintomas como diarreia com sangue, febre, dores abdominais e necrose intestinal (SHIRLEY e MOONAH, 2016).

2.2 Gênero *Entamoeba*

O gênero *Entamoeba* engloba várias espécies, entre as quais podemos citar a *E. histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, *Entamoeba polecki*, *Entamoeba coli* e *Entamoeba hartmanni*, sendo que apenas a *E. histolytica* é considerada patogênica para os seres humanos, as demais são comensais (GOMES et al., 2014).

O gênero *Entamoeba* apresenta diferentes estágios de desenvolvimento, entre eles o trofozoíto e o cisto. A forma móvel, metabolicamente ativa e que se multiplica por divisão binária é denominada de trofozoíto (Figura 1B). A forma imóvel, revestida por uma parede cística que dá resistência à adversidades do meio externo é denominada de cisto. Este, ao ser liberado no ambiente juntamente com as fezes, pode infectar outros hospedeiros via oral-fecal (CALEGAR et al., 2016).

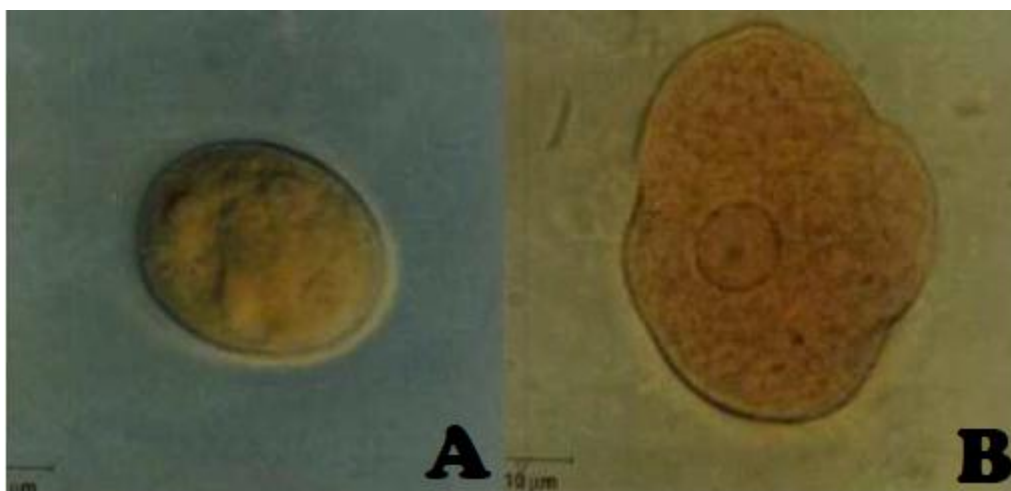


Figura 1: Cisto (A) e trofozoíto (B) de *Entamoeba histolytica*. **Fonte:** Freitas, 2007 (adaptado).

As espécies do gênero *Entamoeba* foram classificadas de acordo com o número de núcleos do cisto maduro. As que contêm até quatro núcleos são consideradas do Complexo histolytica, entre elas estão a *E. histolytica*, *E. díspar* e *E. moshkovskii*. As amebas citadas anteriormente podem ser diferenciadas por sua morfologia, através do tamanho do trofozoíto e do cisto, formas dos componentes citoplasmáticos e sua estrutura, sendo que observar essa diferenciação através do microscópio de luz é bastante difícil. (NEVES, 2016).

2.3 Características Morfológicas

As formas de trofozoítos e cistos (Figura 2) podem ser observadas e diferenciadas através da microscopia. Os trofozoítos apresentam uma amplitude de formas e tamanhos (podem variar de 10 a 60 µm), possuem forma ameboide, cromatina nuclear periférica e pseudópodes, que são responsáveis pela alimentação e movimentação do parasito. Já a forma cística varia de 8 a 20 µm de diâmetro, é esférica com paredes que contêm quitina e glicoproteínas, o que ajuda na resistência e rigidez da mesma. Os cistos contêm de um a quatro núcleos e em seu interior encontram-se corpos cromatóides responsáveis pela síntese proteica, além de vacúolos de glicogênio. O pré-cisto é a forma de transição entre o trofozoíto e o cisto, sendo menor que o trofozoíto e mais arredondado (OLIVEIRA et al., 2015).

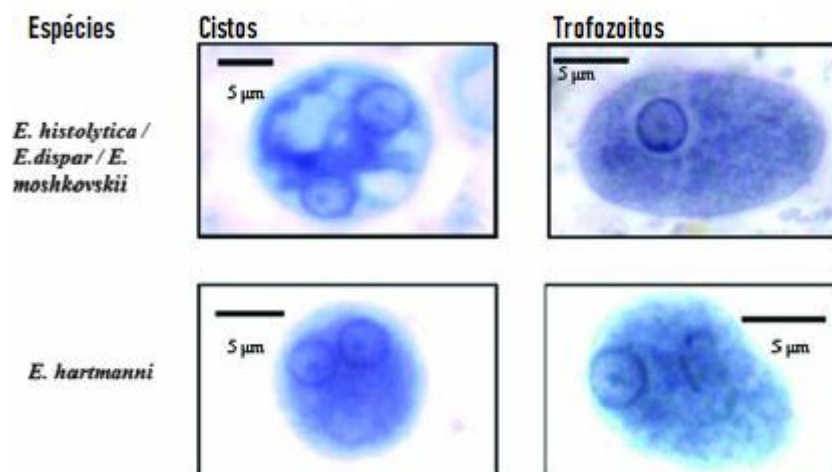


Figura 2: Cistos e trofozoítos de *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* e *E. hartmanni*. **Fonte:** Fotedar, 2007 (adaptado).

2.3.1 *E. histolytica*/*E. dispar*

A espécie *E. histolytica* foi descrita pela primeira vez por Fedor Losch, em 1875; ele foi o primeiro a observá-la microscopicamente, mas só posteriormente o nome latino foi criado por Fritz Schaunin em 1903. A maioria das infecções por *E. histolytica* é assintomática e, quando sintomática, apresenta um período de incubação de uma a quatro semanas após a infecção, quando os trofozoítos invadem o intestino e penetram na mucosa (MELES e BEKELE, 2017). *E. dispar* e *E. histolytica* são morfologicamente idênticas e podem colonizar a mucosa intestinal; entretanto, possuem diferenças genotípicas e fenotípicas, responsáveis por tornar a *E. histolytica* patogênica (XIMENEZ et al., 2010). As espécies *E. histolytica* e *E. dispar* possuem conjuntos de genes semelhantes que codificam os principais fatores de patogenicidade, entretanto a *E. histolytica* secreta aproximadamente 10 a 1.000 vezes mais proteases que *E. dispar*, sendo considerada a mais patogênica entre as espécies de *Entamoeba* (OLIVEIRA et al., 2015).

Os trofozoítos de ambas as espécies medem de 15 a 20 µm, apresentam um núcleo, com cromatina periférica e cariossoma pequeno, compacto, central ou excêntrico, além de um citoplasma fino e granular. Os cistos medem de 10 a 15 µm, sendo os cistos maduros tetranucleados e os imaturos, mononucleados ou binucleados, todos possuindo cromatina periférica com finos grânulos uniformes, cariossoma geralmente central, pequeno e compacto. Eventualmente, apresentam corpos cromatóides com bordas arredondadas e lisas. (FOTEDAR, 2007).

2.3.2 *E. moshkovskii*

Os cistos e trofozoítos da espécie *E. moshkovskii* são bastante semelhantes à *E. histolytica*/*E. dispar*, podendo ser confundidos durante a análise das fezes através da microscopia. Os cistos de *E. moshkovskii* variam de 5 a 16 µm, apresentam de um a quatro núcleos, cromatina periférica, cariossoma central e pequeno. Os trofozoítos medem de 9 a 29 µm, apresentam citoplasma fino e granular, cariossoma pequeno, compacto e central (FOTEDAR, 2007; NEAL, 1953).

A espécie geralmente tem vida livre e é encontrada em diversos ambientes, como esgoto, água e sedimentos do rio. Alguns estudos apontam a ocorrência da *E. moshkovskii* em fezes humanas em países como Estados Unidos, Turquia, Bangladesh, Austrália, Índia, Brasil, Itália e Irã (CLARK e DIAMOND, 1991). Desses países, a Índia e Bangladesh relataram complicações gastrointestinais em indivíduos infectados. Entretanto, não foram realizados outros exames para detectar vírus ou bactérias nesses pacientes para eliminar a possibilidade de outros agentes patológicos (LÓPEZ et al., 2015).

2.3.3 *E. hartmanni*

Outra espécie, a *E. hartmanni*, também apresenta características morfológicas semelhantes ao complexo *histolytica* (*E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*). Sua principal diferença é que pode ser distinguida da *E. histolytica* pelo tamanho de seus cistos, que são menores, medindo de 7 a 12 µm. Sua estrutura nuclear é semelhante a *E. histolytica*, entretanto a cromatina pode ser irregular. Apresenta cariossoma pequeno, corpos cromatóides arredondados ou quadrados e pequenos. É uma ameba que vive como comensal no intestino grosso (NEVES, 2016).

Assim como as outras espécies citadas, a *E. hartmanni* é difícil de ser diferenciada das demais através da microscopia, pois esta espécie pode apresentar cistos maiores e serem confundidas com as outras espécies do complexo (GOMES et al., 2014).

A diferenciação entre as espécies continua sendo um grande desafio para os laboratórios de parasitologia clínica. O método molecular é um grande passo para esse diagnóstico se tornar mais preciso.

2.4 Métodos Diagnósticos

2.4.1 Diagnóstico Coproparasitológico

O método mais comum de diagnóstico da amebíase é o exame coproparasitológico, consistindo na análise microscópica da amostra fecal. Esse método é utilizado há muitos anos, mas os resultados não são tão favoráveis, pois possuem pouca sensibilidade, pode ocorrer falsos resultados devido a falhas inerentes ao microscopista e à semelhança da morfologia entre as espécies (NGUI et al., 2012).

O exame de fezes pelo microscópio óptico não é suficiente para a identificação e diferenciação das espécies de *Entamoeba*. Entretanto, dependendo dos sintomas do paciente, como diarreia sanguinolenta, por exemplo, e se forem encontrados eritrócitos fagocitados pelos trofozoítos, o diagnóstico de *E. histolytica* pela microscopia é considerado eficiente (NGUI et al., 2012).

2.4.2 Diagnóstico Molecular

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica molecular que permite o estudo de sequências de ácidos nucleicos. Essa técnica promove a replicação de cadeias de DNA *in vitro* através de etapas da variação de temperatura, sendo que a amplificação do DNA é realizada empregando-se nucleotídeos, primers e uma DNA polimerase termoestável, sendo possível adquirir através de uma fita molde múltiplas cópias de uma sequência específica do ácido nucleico. (HASS e TORRES, 2016). Alguns métodos moleculares são considerados úteis para a identificação e diferenciação confiável das espécies do gênero *Entamoeba*. A Reação em Cadeia da Polimerase(PCR), incluindo a PCR convencional, multiplex-PCR e a Nested-PCR, são meios para diferenciar a *E. histolytica*, *E. dispar*, *E. moshkovskii* e *E. hartmanni* em diversas amostras (GOMES et al., 2014).

Mesmo após quase vinte anos das primeiras pesquisas sobre o uso da PCR para o diagnóstico molecular, essa técnica ainda não tem fácil acessibilidade, devido ao seu alto custo, necessidade de alta tecnologia em laboratórios e de local exclusivo para sua utilização (HASS e TORRES, 2016). Apesar das dificuldades, os métodos moleculares baseados na PCR estão se tornando cada vez mais predominantes para o diagnóstico de parasitoses intestinais e para obter dados epidemiológicos mais precisos, uma vez que mostram ser mais sensíveis que a microscopia e técnicas de imunodiagnóstico (LLEWELLYN et al., 2016).

2.4.2.1 PCR Convencional

Na PCR convencional é feita uma reação contendo um par de primers capaz de identificar apenas uma espécie. A sequência de primers é responsável pela codificação da fita na qual, após seu anelamento, ocorre a amplificação de regiões específicas de ácidos nucleicos, passando por três etapas com variação de temperaturas no termociclador. A primeira etapa é a desnaturação da fita e abertura da dupla hélice de DNA; a segunda etapa é o anelamento dos primers; e a terceira etapa é a extensão da fita pela adesão dos nucleotídeos contidos no PCR mix à nova cadeia que está sendo formada a partir dos primers, estas etapas repetidas por diversos ciclos (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2017).

2.4.2.2 Nested-PCR

A Nested-PCR tem princípios semelhantes a PCR convencional, porém apresenta modificações para obter uma maior especificidade e sensibilidade. Envolve o uso de dois primers e duas reações de PCR (HASS & TORRES, 2016).

Primeiramente, o segmento genômico é amplificado de forma geral por uma PCR convencional com primers para sítio comum ao gênero da espécie estudada. Posteriormente, o produto desta reação é utilizado para o Nested, sendo que a amplificação ocorrerá em uma sequência-alvo, de acordo com o primer espécie-específico para determinada identificação. Esse tipo de PCR tem como vantagem a especificidade e eficiência (NGUI et al., 2012).

Com esta técnica a especificidade e sensibilidade da amplificação do DNA podem ser bastantes eficientes; entretanto, tem como desvantagem o risco de contaminação devido a manipulações adicionais por necessitar de duas reações (NGUI et al., 2012).

2.4.2.3 Multiplex-PCR

A Multiplex-PCR é um método molecular responsável por amplificar diversas sequências alvos em uma única PCR, utilizando diversos pares de primers específicos para cada espécie. Foi criada para identificação de patógenos, análise de mutação, detecção de RNA, estudos forenses, entre outros (ZEBARDAST et al., 2014).

A reação é constituída de primers diferentes que possuem condições semelhantes de amplificação e os fragmentos de DNA produzidos apresentam tamanhos distinguíveis. Com a finalidade de promover uma diferenciação entre várias espécies ou

gêneros microbianos, esse teste é considerado único e bastante específico (HASS & TORRES, 2016).

A Multiplex-PCR apresenta diversas vantagens, entre elas, maior agilidade na obtenção dos resultados, economia nos reagentes, vários *locus* são amplificados simultaneamente em uma mesma reação e utiliza uma quantidade menor de ácido nucleico para o diagnóstico, que pode ser um fator limitante (HASS & TORRES, 2016).

Estes métodos moleculares foram utilizados no presente trabalho por meio da padronização do protocolo para cada técnica, com o propósito de obter melhores resultados na diferenciação de espécies do complexo *histolytica* e da *E. hartmanni*, visando identificar a melhor técnica para utilização na diferenciação de um número maior de amostras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Otimizar técnicas de PCR para obter melhores resultados na diferenciação de espécies do complexo *histolytica* e da *E. hartmanni*.

3.2 Objetivos Específicos

- Diferenciar espécies do gênero *Entamoeba* usando a técnica molecular da PCR.
- Determinar a melhor técnica molecular para diferenciação de amebas do complexo *histolytica* e *E. hartmanni*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção das amostras

Um total de 16 amostras positivas para *E. histolytica*/*E. dispar* foram cedidas pelo Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEPaT) da Universidade Federal de Sergipe.

4.2 Extração do DNA

As amostras fecais foram submetidas à extração de DNA utilizando o kit QIAmpFast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, em tubos Eppendorfs de 2 mL, previamente identificados, foram colocados 200 mg de amostra fecal e adicionado 1 ml de InhibitEX Buffer. As amostras foram homogeneizadas em vortex por 1 minuto, aquecidas em banho-maria a 80°C por 5 minutos, novamente homogeneizadas em vortex por 15 segundos e então centrifugadas a 14000 rpm por 1 minuto, para sedimentar as partículas. Em novos Eppendorfs de 1,5 mL foi adicionado 15 µL de Proteinase K com posterior adição de 200 µL do sobrenadante da reação anterior e de 200 µL de Buffer AL, com homogeneização em vortex por 15 segundos, seguida de incubação a 70°C por 1 minuto.

Após a incubação, foram adicionados 200 µL de etanol puro, com homogeneização do lisado. Aplicou-se cuidadosamente 600 µL do lisado na coluna com centrifugação por 1 minuto. A coluna foi transferida para um novo tubo de 2 mL, descartando o tubo contendo o filtrado. Foi adicionado 500 µL de tampão AW1 à coluna e centrifugou-se por 1 minuto, descartando o tubo de coleta. A coluna foi colocada em novo tubo Eppendorf de 2 mL com adição de 500 µL do tampão AW2, seguida de centrifugação por 3 minutos e transferência para um novo tubo de 2 mL após a centrifugação. Ao final da extração, o DNA foi eluído em 200 µL, sendo a coluna centrifugada por 1 minuto e o DNA extraído transferido para novo tubo identificado.

4.3 Reação em Cadeia da Polimerase para amebas do complexo *histolytica* e *E. hartmanni*

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para a padronização de três protocolos para a amplificação de fragmentos do DNA dos parasitos estudados utilizando o PCR convencional, o Nested-PCR e o PCR-Multiplex.

4.3.1 Primers utilizados

Primers	Sequência	Tamanho do produto	Gene	Espécie	PCR	Referência
Ehart-R Ehart-F	ATTGTCTTCACTATTCCATGCC CCAGCTTTCCAAACATGATG	186 pb	rRNA	<i>E. hartmanni</i>	Convencional	Gomes e cols. (2014)
E1 E2	TGCTGTGATTAAAACGCT CAGATCTAGAAACAATGCTTCTCT	1076 pb	SSU rRNA	Gênero <i>Entamoeba</i>	Primeira Reação do Nested-PCR	Paglia & Viscas (2004)
Eh-L Eh-R	ACATTTTGAAGACTTTATGTAAGTA CAGATCTAGAAACAATGCTTCTCT	427 pb	SSU rRNA	<i>E. histolytica</i>	Nested-PCR	Paglia & Visca (2004)
Ed-L Ed-R	GTTAGTTATCTAATTTTCGATTAGAA CACCCTTACTATCCCTACC	195 pb	SSU rRNA	<i>E. dispar</i>	Nested-PCR	Paglia & Visca (2004)
Mos 1 Mos 2	GAAACCAAGAGTTTCACAAC CAATATAAGGCTTGGATGAT	553 pb	SSU rRNA	<i>E. moshkovskii</i>	Nested-PCR	Paglia & Visca (2004)
EmR EdR EhR EntaF	TGACCGGAGCCAGAGACAT CACCCTTACTATCCCTACC GATCTAGAAACAATGCTTCTCT ATGCACGAGAGCGAAAGCAT	580 pb 752 pb 166 pb	rRNA	<i>E. moskovskii</i> <i>E. dispar</i> <i>E. histolytica</i>	Multiplex-PCR	Hamzah e cols. (2006)

4.3.2 PCR convencional

A PCR convencional foi empregada na detecção de *E. hartmanni*, seguindo o protocolo de Gomes e cols. (2014). Para padronização da reação foram realizadas modificações na temperatura de anelamento, número de ciclos, quantidade de primers e DNA. Inicialmente foi realizado um gradiente de temperatura (45, 47, 49, 51, 53 e 55°C), alterando o volume de primers (0,5 µL e 1,0 µL de cada primer), a quantidade de ciclos para 35 ciclos e DNA para 2,5 µL.

REAÇÃO (Volume final 25 µL)						
PCR Convencional para <i>E. hartmanni</i>	PCR Mix (Ampliqon)	Primers	DNA	Água ultrapura	Ciclos da PCR	Condições de temperatura
Protocolo de Gomes e cols. (2014)	12,5 µL	1 µL de cada primer (Ehart-F e Ehart-R)	2 µL	9,5 µL	40	94°C - 3 min 94°C - 30 seg 55°C - 30 seg 72°C - 30 seg 72°C - 7min 4min ∞
Modificações para otimização da técnica	-	0,5 µL	2,5 µL	-	35	Temperatura de anelamento (45,47,49,51,53 e 55°C)

4.3.3 Primeira Reação do Nested-PCR

A reação de Nested-PCR foi utilizada para detecção de *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*, de acordo com o protocolo descrito por Paglia e Visca (2004), com modificações.

Para padronização da primeira reação, foram realizadas modificações na temperatura de anelamento, quantidade de primers, quantidade de DNA e número de ciclos. Para a primeira reação do Nested-PCR foi feito um gradiente da temperatura de anelamento (45, 48, 50, 52, 54 e 55°C), modificando a quantidade de primer para 0,5 µL, de DNA para 2,0 µL e 25 ciclos.

1º REAÇÃO (Volume final 25 µL)						
Nested-PCR para <i>E. histolytica</i> , <i>E. dispar</i> e <i>E. moshkovskii</i> .	PCR Mix (Ampliqon)	Primers	DNA	Água ultrapura	Ciclos da PCR	Condições de temperatura
Protocolo de Paglia e Visca (2004)	12,5 µL	1 µL de cada primer (E1 e E2)	2,5 µL	8,0 µL	40	95°C - 3 min 94°C - 50 seg 50°C – 1min 30 seg 72°C- 2 min 72°C - 7min 4min ∞
Modificações para otimização da técnica	-	0,5 µL	2 µL	-	25	Temperatura de anelamento (45, 48, 50, 52, 54 e 55°C)

4.3.4 Segunda Reação do Nested-PCR

Para a padronização da segunda reação foram feitas modificações na temperatura de anelamento (45 e 50°C), quantidade de material amplificado (5,0 µL e 2,5 µL) e quantidade de primer para 1,0 µL.

2º REAÇÃO (Volume final 25 µL)						
Nested-PCR para <i>E. histolytica</i> , <i>E. dispar</i> e <i>E. moshkovskii</i> .	PCR Mix (Ampliqon)	Primers	Amplificado da 1º reação	Água ultrapura	Ciclos da PCR	Condições de temperatura
Protocolo de Paglia e Visca (2004)	12,5 µL	0,5 µL de cada primer (Eh-R/Eh-L, Ed-L/Ed-R e Mos 1/Mos 2)	2,5 µL	9,0 µL	40	95°C - 3 min 94°C - 50 seg 58°C – 1min 30 seg 72°C- 2 min 72°C - 7min 4min ∞
Modificações para otimização da técnica	-	1,0 µL	5 µL	-	-	Temperatura de anelamento (45 e 50 °C)

4.3.5 Multiplex-PCR

A PCR Multiplex foi empregada para detecção de *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*, de acordo com o protocolo de Hamzah e cols. (2006), com modificações.

Para padronização, foram realizadas modificações na temperatura de anelamento, quantidade de DNA e número de ciclos. Foi feito gradiente de temperatura de anelamento (50, 52, 54, 56, 58 e 60°C), quantidade de DNA alterado para 2,5 µL e 35 e 40 ciclos.

REAÇÃO (Volume final 25 µL)						
Multiplex-PCR para <i>E. histolytica</i> , <i>E. dispar</i> e <i>E. moshkovskii</i> .	PCR Mix (Ampliqon)	Primers	DNA	Água ultrapura	Ciclos da PCR	Condições de temperatura
Protocolo de Hamzah e cols. (2006)	12,5 µL	0,5 µL de cada primer (Eh-R/Eh-L, Ed-L/Ed-R e Mos 1/Mos 2)	5 µL	5,5 µL	30	94°C - 3 min 95°C – 1 min 54°C – 1min 72°C- 1 min 72°C - 7min 4min ∞
Modificações para otimização da técnica	-	-	2,5 µL	-	35 e 40	Temperatura de anelamento (50, 52, 54, 56, 58 e 60°C)

4.4 Análise dos produtos da PCR

A eletroforese dos produtos da PCR foi realizada em gel de agarose a 1,5% corado com Brometo de Etídio. Para isso, 10 µL das amostras foram adicionados aos poços do gel e submetidos a eletroforese sob as condições: 100 Volts, 150 miliAmperes, 60 Watts por 120min, corridos em um tampão TBE 1x durante 90 minutos, conforme Gomes e cols (2014). A iluminação ultravioleta permitiu localizar o fragmento de DNA amplificado por comparação a um marcador de tamanho molecular (LowRanger 100bp DNA Ladder) que apresenta fragmentos variando de 2000 a 100 pares de bases.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PCR convencional para a detecção de *E. hartmanni*

Quando realizada a metodologia de Gomes e cols. (2014) para *E. hartmanni*, observou-se bandas inespecíficas (Figura 3), sendo feitas modificações para a obtenção de um melhor resultado na padronização da PCR. As amostras 3 e 4 tiveram fragmento com 186 pb amplificado para a espécie *E. hartmanni*.

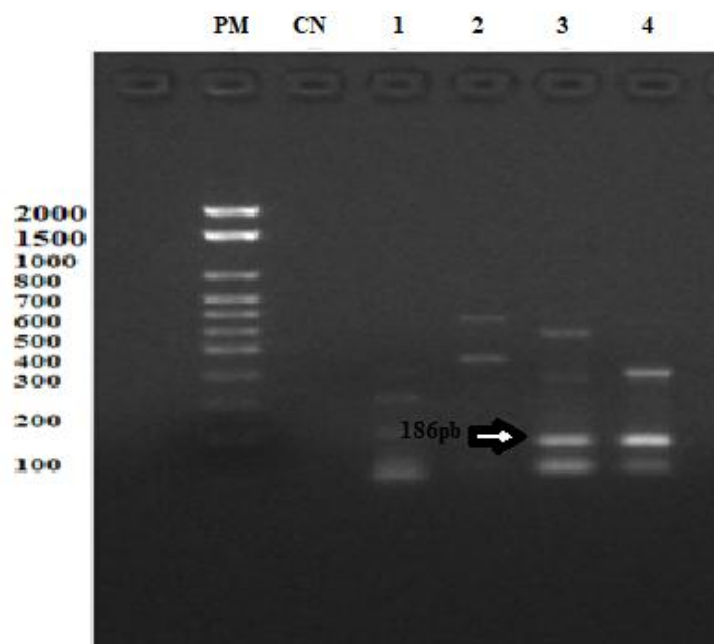


Figura 3: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na PCR para *E. hartmanni* (1,0 µL de cada primer, 2,0 µL de DNA, 55°C de temperatura de anelamento e 40 ciclos), onde observa-se amplificação de um fragmento de 186 pb para as amostras 3 e 4 (poços 5 e 6). PM: Peso Molecular. CN: Controle Negativo. A seta na imagem indica a amplificação para *E. hartmanni* (186 pb) para as amostras 3 e 4.

As amostras 3 e 4 foram escolhidas para a otimização por apresentarem produtos amplificados na região de 186 pb na PCR (Figura 3), sendo esta região indicativa da presença de *E. hartmanni* conforme Gomes e cols. (2014).

Foi realizado um gradiente de temperatura de anelamento para determinar em qual temperatura há menor amplificação de produtos inespecíficos, melhorando assim a especificidade da reação (Figura 4).

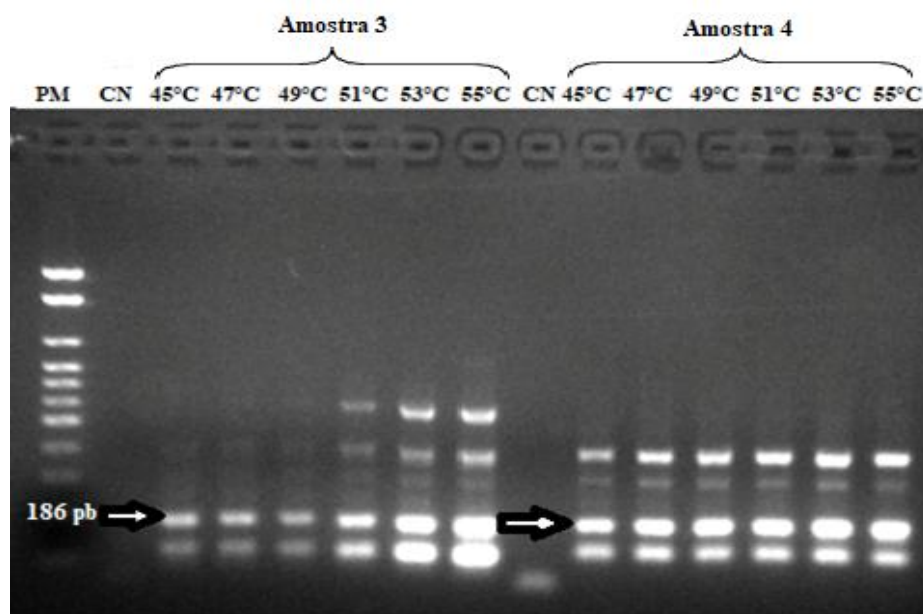


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do gradiente de temperatura de anelamento da PCR para *E. hartmanni* (0,5 μ L de cada primer, 2,0 μ L de DNA e 35 ciclos), com amplificação de um fragmento de 186 pb. PM: Peso Molecular. CN: Controle Negativo a 55°C. As setas na imagem indicam a amplificação para *E. hartmanni* (186 pb) para as amostras 3 e 4.

Foi observado no gradiente de temperatura melhor resultado para as temperaturas 47°C e 49°C, por apresentarem menos bandas inespecíficas. Entretanto, foi realizado outra PCR com 48°C, 0,5 μ L de cada par de primer e 35 ciclos, visando diminuir a amplificação de produtos inespecíficos na reação (Figura 5).

Apesar de serem observadas bandas inespecíficas no gel, a banda referente a espécie *E. hartmanni* apresenta-se amplificada, outras bandas encontradas não comprometem o diagnóstico molecular.

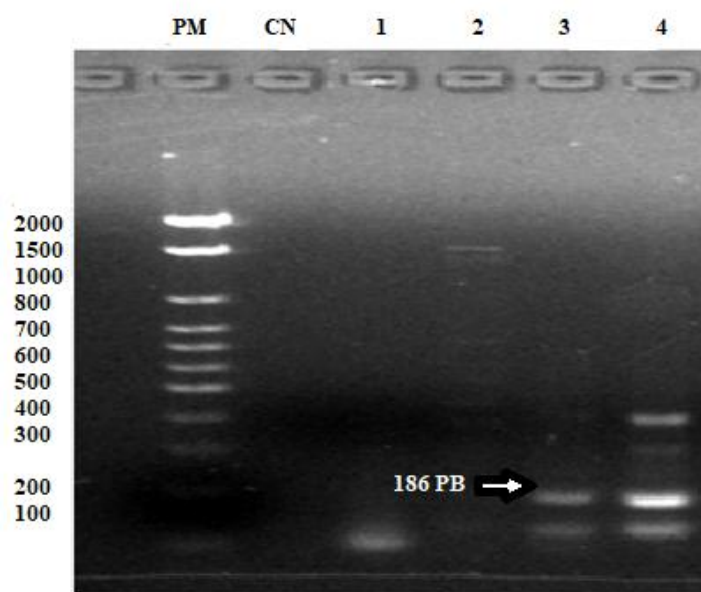


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na PCR para *E. hartmanni* (0,5 μ L de cada primer, 2,0 μ L de DNA, anelamento a 48°C e 35 ciclos), com amplificação de um fragmento de 186 pb (Amostras 3 e 4). PM: Peso molecular. CN: Controle negativo. Seta: amplificação para *E. hartmanni* (186 pb) para as amostras 3 e 4.

Após ser realizada a padronização da reação da PCR convencional para *E. hartmanni*, o objetivo do trabalho seria testar uma quantidade maior de amostras; entretanto, houve uma queda de energia na UFS, o que causou a degradação da PCR Mix, ocasionando o aparecimento de muitas bandas inespecíficas no gel da PCR (Figura 6).

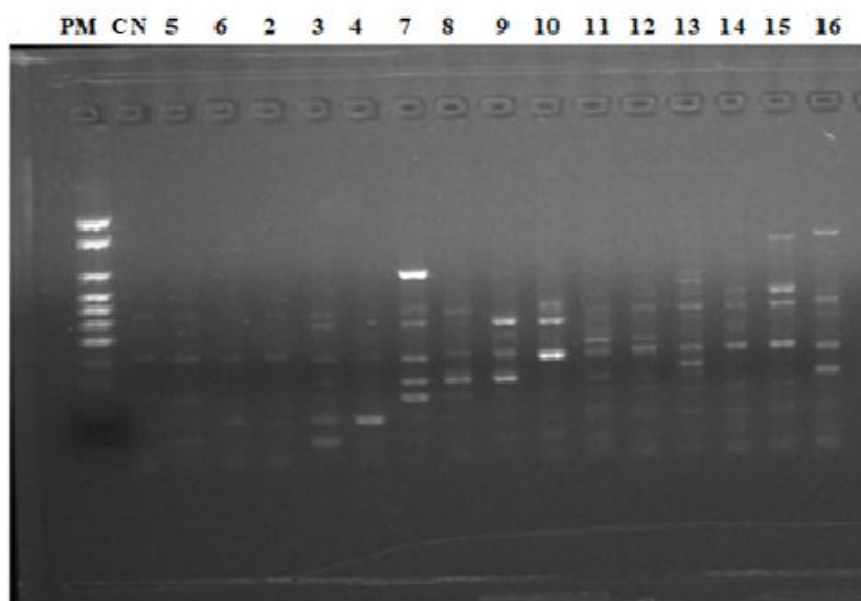


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na PCR para *E. hartmanni* (0,5 μ L de cada primer, 2,0 μ L de DNA, anelamento a 48°C e 35 ciclos) para as 16 amostras. PM: Peso molecular. CN: Controle negativo. Observa-se muitas bandas inespecíficas, devido à degradação dos componentes do PCR Mix utilizado na reação.

5.2 Nested-PCR para *E. histolytica*, *E. dispar* e *E. moshkovskii*

A primeira reação da Nested-PCR foi realizada de acordo com Paglia e Visca (2004), com temperatura de anelamento de 50°C e 40 ciclos. Foram modificadas a quantidade do primer, para 0,5 μ L, e a quantidade de DNA, de 5,0 μ L para 2,5 μ L. Em adição, foi realizado teste da PCR com 25 ciclos (Figura 7).

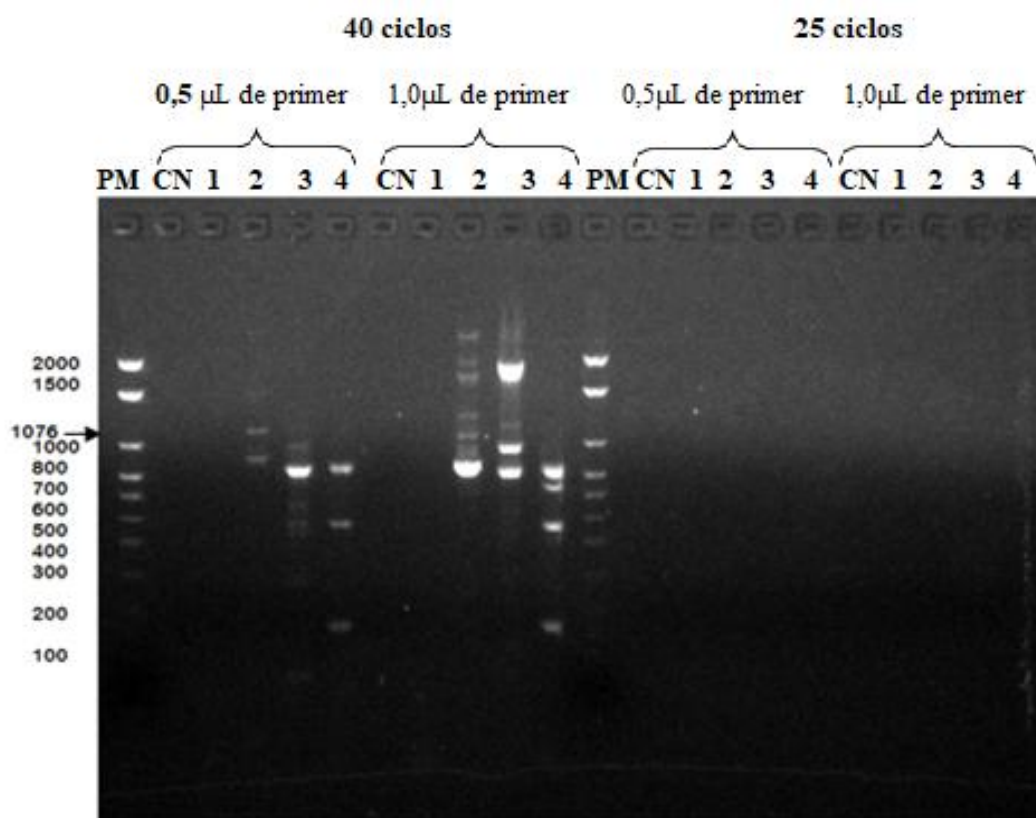


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na primeira reação de PCR da Nested-PCR (temperatura de anelamento de 50°C, 2,5 µL de DNA), com amplificação dos produtos na região de 1.076 pb para amostra 2 (seta). PM: Peso molecular. CN: Controle negativo.

Pode-se observar que não houve amplificação na reação com 25 ciclos, pois o baixo número de ciclos impossibilitou a produção de muitas cópias da região de interesse do DNA, sendo assim, maior quantidade de ciclos pode tornar os resultados mais satisfatórios (FOTEDAR et al., 2007). A reação com 40 ciclos, apesar de apresentar algumas bandas inespecíficas, teve material amplificado próximo a 1,076 pb, principalmente ao utilizar 0,5 µL de primers.

Como continuou sendo observada amplificação de bandas inespecíficas após as modificações na metodologia do autor, foi realizado o gradiente de temperatura de anelamento para observar em qual temperatura houve menor amplificação de produtos inespecíficos (Figura 8).

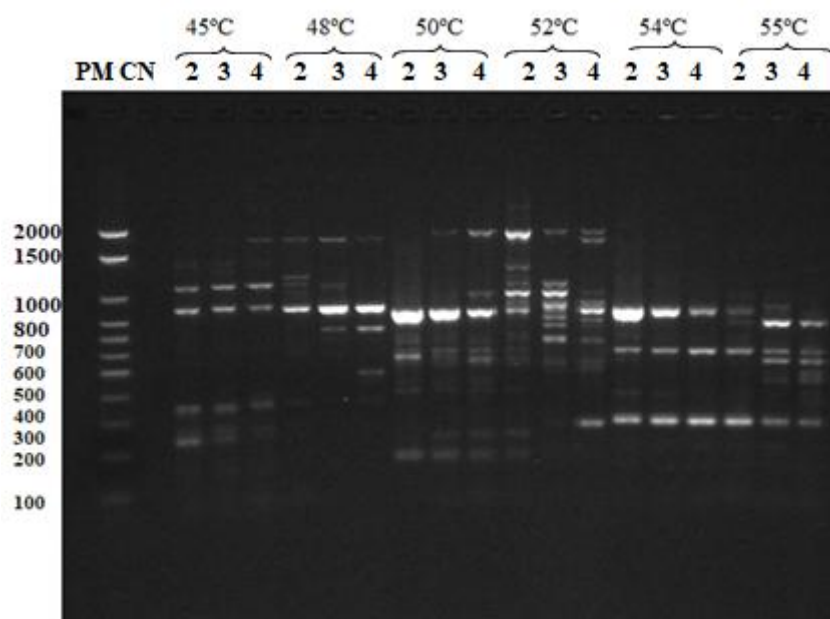


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na primeira reação da Nested-PCR (40 ciclos de amplificação, 0,5 μ L de primers e 2,5 μ L de DNA), com amplificação dos produtos na região de 1.076 pb. PM: Peso molecular. CN: Controle negativo.

Observou-se que o melhor resultado para a primeira reação da Nested-PCR foi ao utilizar 48°C (figura 9) como temperatura de anelamento, pois esta apresentou menor quantidade de bandas inespecíficas.

Após a padronização da primeira reação da Nested-PCR com as condições de 40 ciclos, temperatura de anelamento a 48°C, 2,5 μ L de DNA e 0,5 μ L de primers, foram acrescentadas as amostras AR01 e AR03, positivas para *E. histolytica*/*E. dispar* no exame coproparasitológico. A figura 9 indica a positividade destas amostras para o gênero *Entamoeba*.

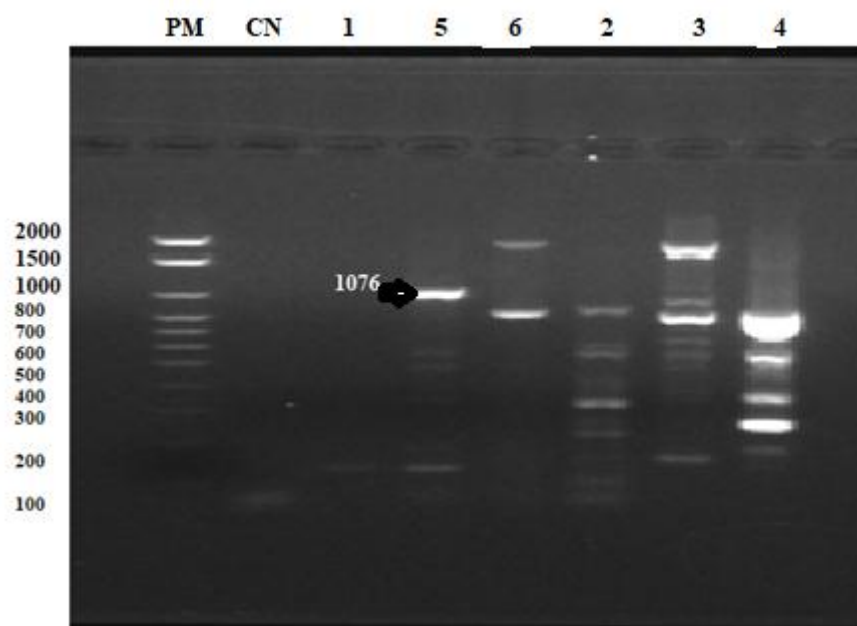


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na primeira reação da Nested-PCR (40 ciclos, temperatura de anelamento a 48°C, 2,5 µL de DNA e 0,5 µL de primers), com amplificação dos produtos na região de 1.076 pb. PM: Peso molecular. CN: Controle negativo.

Apesar de a padronização da primeira reação do Nested-PCR ter resultados favoráveis, observou-se que após a queda de energia ocorreu problema semelhantes para a PCR para *E. hartmanni*, observando-se rastros no gel de agarose após a eletroforese, como mostra a figura abaixo (Figura 10):

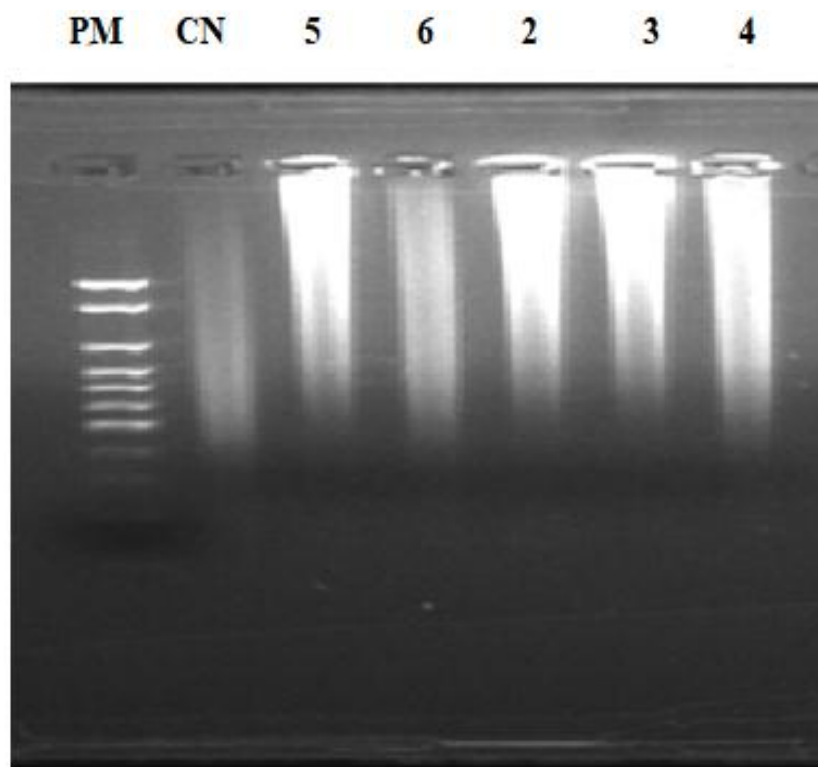


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na primeira reação da Nested-PCR, com formação de rastros devido à perda do PCR mix. PM: Peso molecular. CN: Controle negativo.

A segunda reação do Nested-PCR, inicialmente foi realizada seguindo o protocolo de Paglia e Visca (2004) com modificações. A quantidade de DNA foi alterada de 5 μ L para 2,5 μ L e a temperatura de anelamento foi modificada de 58°C para 45°C e 50°C. (Figura 11).

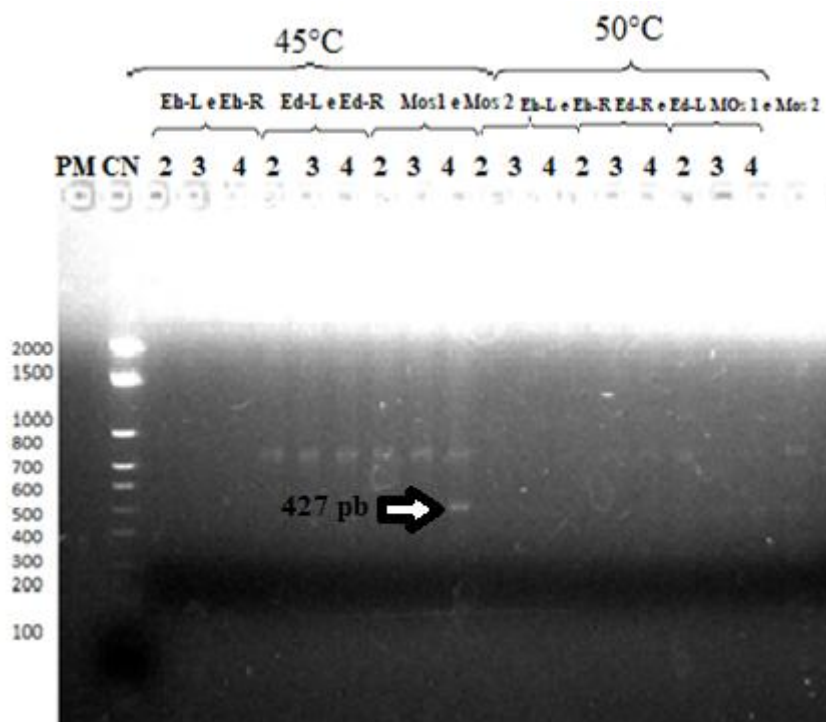


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na segunda reação da Nested-PCR, com amplificação dos produtos nas regiões 427 pb (*E. histolytica*), 553 pb (*E. moshkovskii*) e 195 pb (*E. dispar*). PM: Peso molecular. CN: Controle negativo. A seta na imagem indica a amplificação para *E. histolytica*. Para a espécie *E. dispar* e *E. moshkovskii* não houve amplificação em nenhuma das amostras.

Observa-se que a amostra 4 amplificou para *E. histolytica* (427 pb) e que nenhuma amostra obteve amplificações para *E. dispar* e *E. moshkovskii*.

A reação com temperatura de anelamento a 50°C não apresentou amplificação do DNA. Já a reação com 45°C apresentou amplificação, mas como as bandas foram discretas, optou-se por aumentar a temperatura para 48°C (Figura 12).

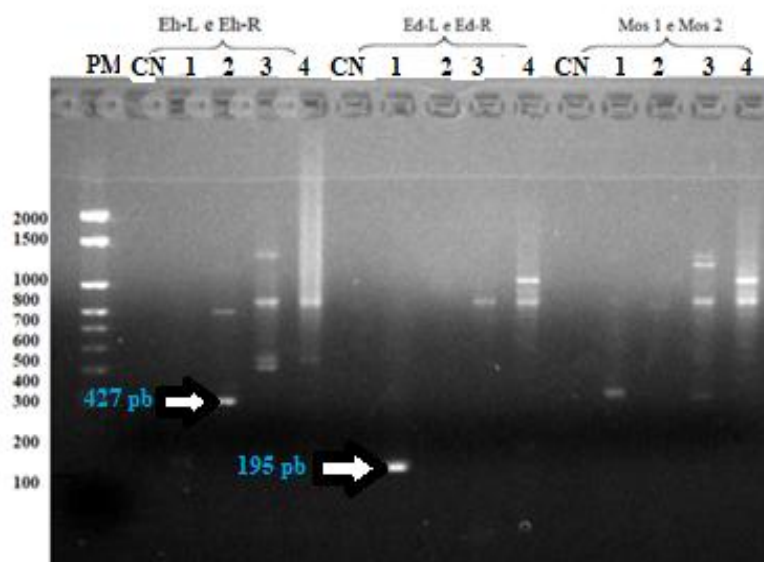


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na segunda reação da Nested-PCR (temperatura de anelamento de 48°C, 2,5 µL de DNA, 0,5 µL de primer e condições de 40 ciclos) com amplificação dos produtos nas regiões 427 pb (*E. histolytica*) e 195 pb (*E. dispar*). PM: Peso molecular. CN: Controle negativo. As setas na imagem indicam a amplificação para *E. histolytica* (Amostra 2) e *E. dispar* (Amostra 1). Para a espécie *E. moshkovskii* não houve amplificação em nenhuma das amostras.

Foi extraído DNA de outras 13 amostras para continuar a padronização, mas, devido ao problema de queda de energia na UFS que durou alguns dias, foi perdido o PCR Mix, impossibilitando a continuidade dos experimentos PCR. As reações feitas utilizando o PCR Mix alterado apresentaram rastros nos géis de agarose após a eletroforese, assim como ocorreu na primeira reação da Nested-PCR.

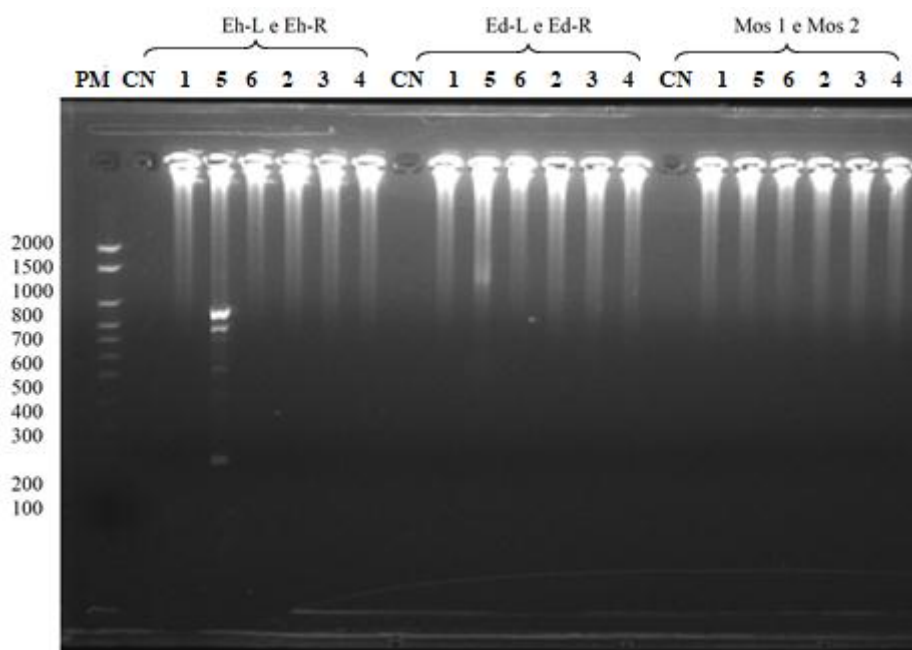


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na segunda reação da Nested-PCR (temperatura de anelamento de 48°C, 2,5 µL de DNA, 0,5 µL de primer e condições de 40 ciclos), apresentando rastro devido à perda do PCR Mix. PM: Peso Molecular. CN: Controle negativo.

5.3 Multiplex-PCR

Para o multiplex-PCR, não foi possível padronizar a reação devido ao problema do PCR Mix citado anteriormente. Apenas foi possível realizar um primeiro teste com as modificações das condições descritas do artigo (Hamzah et al., 2006): 54°C de temperatura de anelamento, 2,5 µL de DNA e 0,5 µL de cada primer. Isto se deveu a ocorrência de degradação do reagente PCR Mix devido a problemas de energia elétrica na instituição, o que ocasionou o aparecimento de bandas inespecíficas.

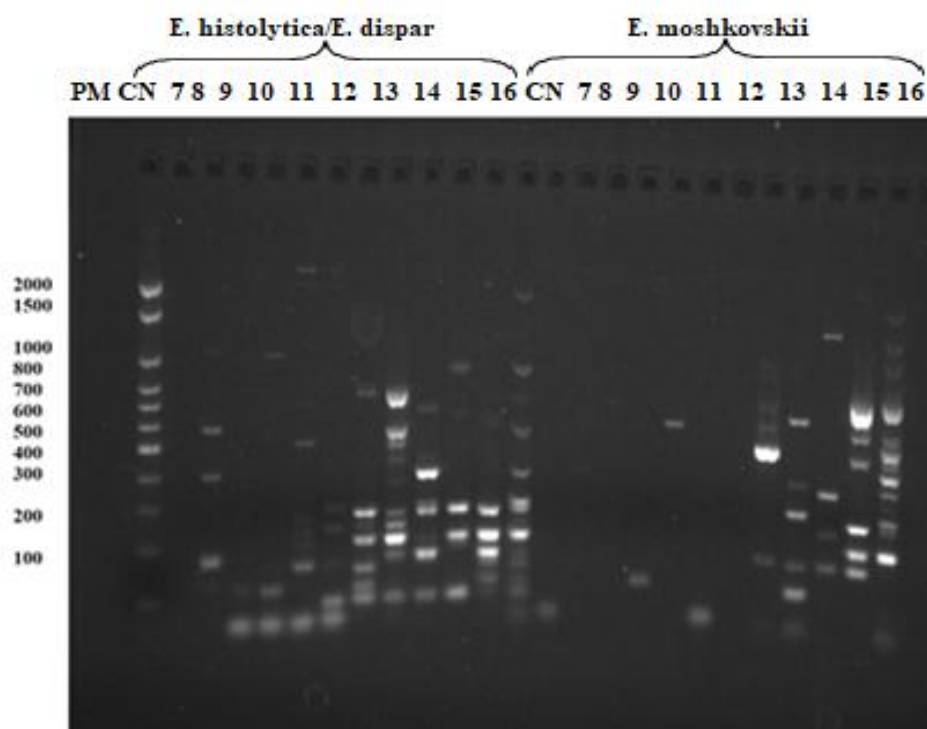


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose (1,5%) do material amplificado na reação de Multiplex-PCR (54°C de temperatura de anelamento, 2,5 µL de DNA e 0,5 µL de cada primer). PM: Peso molecular. CN: Controle Negativo.

6. CONCLUSÃO

Os testes realizados inicialmente com as amostras 1, 2, 3 e 4, permitiu observar que, para *E. hartmanni* e a PCR-Nested, foi possível otimizar as reações com resultados positivos. Em nossos resultados preliminares observou-se que nem todas as amostras foram positivas para a espécie *E. histolytica*, sendo encontradas entre elas as espécies *E. dispar* e *E. hartmanni*.

A provável degradação e perda do reagente PCR Mix, fundamental para a qualidade dos produtos de amplificação, prejudicou a continuidade dos testes de otimização e, conseqüentemente, a realização dos objetivos específicos; entretanto, para as análises das demais amostras não foi possível reproduzir as condições ideais da otimização das PCR.

Há a perspectiva de continuar os testes de otimização para melhorar a identificação e a diferenciação das espécies do complexo *histolytica* e *E. hartmanni*.

Referências

- BUSATO M. A.; DONDONI D. Z.; RINALDI A. L. S.; FERRAZ L. Parasitoses intestinais: o que a comunidade sabe sobre este tema? **Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade**, v. 10, n. 34, p. 1-6, 2015.
- CALEGAR, D. A.; NUNES, B. C.; MONTEIRO, K. J. L.; SANTOS, J. P.; TOMA, H. K.; GOMES, T. F.; LIMA, M. M.; BÓIA, M. N.; CARVALHO-COSTA, F. A. Frequency and molecular characterisation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba moshkovskii*, and *Entamoeba hartmanni* in the context of water scarcity in northeastern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n.2, p. 114-119, 2016.
- CLARK C. G.; DIAMOND L. S. The Laredo strain and other *Entamoeba histolytica*-like amoebae are *Entamoeba moshkovskii*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 46, p. 11–18, 1991.
- FREITAS, M. A. R. Caracterização de Cepas de *Entamoeba histolytica* isoladas de diferentes casos clínicos no Brasil: Análise da expressão de genes possivelmente envolvidos com a patogenicidade. **Biblioteca Digital UFMG**, v. 21, n.36, p. 1-104, 2007.
- FOTEDAR, R.; STARK, D.; BEEBE, N.; MARRIOT, D.; ELLIS, J.; HARKNESS, J. Laboratory Diagnostic Techniques for *Entamoeba* Species. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 511-532, 2007.
- GOMES, T. S.; GARCIA, M. C.; CUNHA, F. S.; MACEDO, H. W., PERALTA, J. M.; PERALTA, R. H. S. Differential Diagnosis of *Entamoeba* spp. in Clinical Stool Samples Using SYBR Green Real-Time Polymerase Chain Reaction. **The Scientific World Journal**, v. 2014, n. 1, p 1-8, 2014.
- HAMZAH, Z.; PETMITR, S.; MUNGTHIN, M.; LEELAYOOVA, S.; PETMITR, P. C. Differential Detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a Single-Round PCR Assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3196-3200.
- HASS, D. J.; TORRES, A. C. D. Aplicações das técnicas de PCR no diagnóstico de doenças infecciosas dos animais. **Revista científica de medicina veterinária**, v. 14, n.26, p. 1-16, 2016.

IBGE, BRASIL. Censo Demográfico, 2010. Disponível em: <www.ibge.com.br> Acesso em: 10/09/2018.

LLEWELLYN, S.; INPANKAEW, T. NERY, S.V.; GRAY, D. J.; VERWEIJ, J.J.; CLEMENTS, A. C. A.; GOMES, S. J.; TRAUB, R.; MCCARTHY, J. S. Application of a Multiplex Quantitative PCR to Assess Prevalence and Intensity of Intestinal Parasite Infections in a Controlled Clinical Trial. Australia. **PLOS Neglected Tropical Disease**, v. 10, n.1, p. 1-19, 2016.

LÓPEZ-LÓPES P.; MARTÍNEZ-LOPEZ M.C.; BOLDO-LÉON X.M.; HERNÁNDEZ-DÁZ Y.; GONZÁLEZ-CASTRO T.B.; TOVILLA-ZÁRATE C.A. e LUNA-ARIAS J.P. Detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in clinical samples through PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 50, n.4, p. 1-7, 2017.

LÓPEZ, M. C.; LEÓN, C. M.; FONSECA, J.; REYES, P.; MONCADA, L.; OLIVEIRA, M. J.; RAMÍREZ, J. D. Molecular Epidemiology of *Entamoeba*: First Description of *Entamoeba moshkovskii* na Rural Area from Central Colombia. **Plos One**, v. 10, n. 10, p 1-11, 2015.

MELES, K.; BEKELE, D. A Ten Years Retrospective and Cross Sectional Study of *Entamoeba histolytica* in Atsbi Wonberta Woreda at Mulu Assefa Hospital, Eastern Tigray Ethiopia. **Pelagia Research Library**, v. 8, n. 4, p. 30-39, 2017.

NEAL, R. A. Studies On The Morphology And Biology Of *Entamoeba moshkovskii* Tshalaia, 1941. **Parasitology**, v. 3, p. 243-68, 1953.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia humana**. 13. ed. São Paulo: Atheneu, p. 141-46, 2016.

NGUI, R.; ANGAL, L.; FAKHRURRAZI, S. A.; LIAN, Y. L. A.; LING, L. Y.; IBRAHIM, J.; MAHMUD, R. Differentiating *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii* using nested polymerase chain reaction (PCR) in rural communities in Malaysia. **Parasites & Vectors**, v. 5, n.187, p. 1-7, 2012.

OLIVEIRA, F. M. S.; NEUMANN, E.; GOMES, M. A.; CALIARI, M. V. *Entamoeba dispar*: Could it be pathogenic. **Tropical Parasitology**, v. 5, n. 1, p. 9-14, 2015.

PAGLIA, M. G. & VISCA, P. An improved PCR-based method for detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in formalin-fixed stools. **Acta Trop**, v. 92, n. 3, p. 273-277, 2004.

RITCHIE, L. S. An ether sedimentation technique for routine stool examinations. **Bulletin of the United States Army Medical Department**, v. 8, n.4, p. 326, 1948.

SANTANA, M. A; ARAÚJO, M. J. A. A infra-estrutura do bairro Santa Maria: Aracaju/SE. 2014. Disponível em: <http://artigos.netsaber.com.br/resumo_artigo_22750/artigo_sobre_a_infra-estrutura_do_bairro_santa_maria:_aracaju/se> Acesso em 10/09/2018.

SHIRLEY, D-A.; MOONAH, S. Fulminant Amebic Colitis after Corticosteroid Therapy: A Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.10, n. 7, p. 1-13, 2016.

WHO. International Travel and Health: Amoebiasis. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/ith/diseases/amoebiasis/en/> Acesso em: 16 abr. 2018.

XIMÉNEZ, C.; CERRITOS, R.; ROJAS L.; DOLABELLA, S.; MORÁN, P.; SHIBAYAMA, M.; GONZÁLEZ, E.; VALADEZ, A.; HERNÁNDEZ, E.; VALENZUELA, O.; LIMÓN, A.; PARTIDA, O.; SILVA, F. Human Amebiasis: Breaking the Paradigm? **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 3, p. 1105-20, 2010.

ZEBARDAST, N.; HAGHIGHI, A.; YEGANEH, F.; SEYYED TABAEI J.; GHARAVI, M. J.; FALLAHI, S.; LASJERDI, Z.; TAGHIPOUR, N.; KOHANSAL, C.; NADERI, F. Application of Multiplex PCR for Detection and Differentiation of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar* and *Entamoeba moshkovskii*. **Iranian Journal of Parasitology**, vol. 9, n. 4, p. 466-473, 2014.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA
LABORATÓRIO DE ENTOMOLOGIA E PARASITOLOGIA TROPICAL
Av. Mal. Rondon, s/n - B. Jardim Rosa Elze - São Cristóvão/SE
CEP 49.100-000 - Tel (79) 2105.6619
E-mail: dolabella@ufs.br



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr(a). está sendo convidado a autorizar a participação, como voluntário, do menor _____, sob sua guarda, da pesquisa denominada “Padrão da resposta imune nas infecções helmínticas”, sob responsabilidade da Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno, do Departamento de Parasitologia da UFMG com a colaboração do Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella da Universidade Federal de Sergipe. A pesquisa tem como objetivo avaliar como o sistema de defesa de cada pessoa responde à infecção por *Ascaris lumbricoides*, popularmente conhecida com “lombriga”. Caso você autorize a participação, será coletada uma amostra de fezes com material de coleta cedido pelos pesquisadores do projeto e, em algumas crianças, será coletada uma amostra de sangue, utilizando materiais individuais, estéreis e descartáveis. Informamos que a coleta de sangue não causa nenhum risco à saúde, podendo haver apenas um leve desconforto e formação de um pequeno “roxo”no local da coleta, mas que melhorará em pouco tempo. Nenhum pagamento será dado pela participação na pesquisa. Os dados e amostras utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador por um período de cinco anos e, após esse tempo, serão destruídos. Informamos que os resultados dos exames (exame parasitológico de fezes e exame de sangue) serão entregues aos responsáveis pelas crianças e, se necessário, encaminhamento ao posto de saúde. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, sendo que uma cópia será arquivada pelo pesquisador e a outra será fornecida a você.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e compreendi as informações fornecidas e desejo participar da pesquisa. Autorizo a coleta de fezes e sangue e a utilização dos mesmos neste projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos resultados para ensino e pesquisa, respeitando-se sempre o direito de não ter o nome identificado. Este formulário está sendo voluntariamente assinado por mim. Em qualquer momento da pesquisa, sei que posso retirar este consentimento, mantendo-se a continuação normal do trabalho.

Local: _____ Data: ____/____/____

Assinatura do Responsável Legal _____

Assinatura do Pesquisador Responsável

Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella – UFS
email: dolabella@ufs.br / fone 79 3194-6619

ANEXO 2

**Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da
Universidade Federal de Sergipe**

UFS - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DE ARACAJÚ
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Padrão da resposta imune nas infecções helmínticas

Pesquisador: Silvio Santana Dolabella

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 66074017.6.1001.5546

Instituição Proponente: FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.164.543

Apresentação do Projeto:

Os autores relatam que apesar da grande frequência das infecções helmínticas para a saúde humana, muitos aspectos básicos da interação destes parasitos com seus hospedeiros ainda não estão totalmente esclarecidos. E por isso tem com este trabalho o objetivo de recrutar indivíduos em idade escolar sob suspeita de infecção por helmintos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar o processo de polarização de células apresentadoras de antígeno e linfócitos em indivíduos naturalmente infectados por *Ascaris* spp.

Objetivo Secundário:

Determinar o perfil fenotípico, plasticidade celular e aspectos funcionais de infócitos Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh e Treg durante a infecção por *Ascaris* spp.- Avaliar o perfil fenotípico, plasticidade celular e aspectos funcionais de células apresentadoras de antígeno durante a infecção por *Ascaris* spp.- Identificação de determinantes antigênicos envolvidos na polarização e/ou modulação da resposta imunológica durante a infecção por *Ascaris* spp.

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

CEP: 49.060-110

UF: SE

Município: ARACAJU

Telefone: (79)2105-1805

E-mail: cephu@ufs.br